

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. November 2002 (14.11.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/089776 A1(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 9/51**,
47/42, 47/48, A61P 25/04, 25/28, A61K 31/197, 31/451,
31/4741, 31/704(DE). ALYAUTDIN, Renad, N. [RU/RU]; Horoshevskoc
sch. 19-128, Moscow, 123007 (RU).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/04735

(74) Anwalt: FLACCUS, Rolf-Dieter; Bussardweg 10, 50389
Wesseling (DE).(22) Internationales Anmeldedatum:
30. April 2002 (30.04.2002)(81) Bestimmungsstaaten (*national*): JP, KR, US.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 21 982.2 5. Mai 2001 (05.05.2001) DE**Erklärungen gemäß Regel 4.17:**

- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten JP, KR, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR)
- Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): LTS LOHMANN THERAPIE-SYSTEME AG
[DE/DE]; Lohmannstrasse 2, 56626 Andernach (DE).**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KREUTER, Jörg
[DE/DE]; Georg-August-Zinn-Strasse 13, 61350 Bad
Homburg (DE). LANGER, Klaus [DE/DE]; An der
Turnhalle 5, 61137 Schöneck (DE). WEBER, Carolin
[DE/DE]; Im Reichen Winkel 34b, 93057 RegensburgZur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.(54) Title: NANOPARTICLES MADE OF PROTEIN WITH COUPLED APOLIPOPROTEIN E FOR PENETRATION OF THE
BLOOD-BRAIN BARRIER AND METHODS FOR THE PRODUCTION THEREOF(54) Bezeichnung: NANOPARTIKEL AUS PROTEIN MIT GEKOPPELTEM APOLIPOPROTEIN E ZUR ÜBERWINDUNG
DER BLUT-HIRN-SCHRANKE UND VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG(57) Abstract: The invention relates to nanoparticles for penetration of the blood-brain barrier, characterized in that they consist of
a hydrophilic protein or a combination of hydrophilic proteins, preferably serum albumen, most preferably of human origin, which
is coupled to apolipoprotein B. the invention also relates to methods for the production of said nanoparticles.(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Nanopartikel zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke, die dadurch
gekennzeichnet sind, dass sie aus einem hydrophilen Protein oder einer Kombination hydrophiler Proteine bestehen, vorzugsweise
aus Serumalbumin, das besonders bevorzugt humanen Ursprungs ist, an die Apolipoprotein B gekoppelt ist, sowie Verfahren zur
Herstellung derartiger Nanopartikel.

BEST AVAILABLE COPY

WO 02/089776 A1

Nanopartikel aus Protein mit gekoppeltem Apolipoprotein E zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke und Verfahren zu ihrer Herstellung

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft Nanopartikel aus einem hydrophilen Protein oder einer Kombination hydrophiler Proteine, vorzugsweise aus Serumalbumin, insbesondere humaner Herkunft, die mittels gebundenem Apolipoprotein E die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, um pharmazeutisch oder biologisch aktive Wirkstoffe in den Liquor cerebrospinalis zu transportieren.

15 Nanopartikel sind Partikel mit einer Größe zwischen 10 und 1000 nm, die aus künstlichen oder natürlichen makromolekularen Substanzen hergestellt werden können. An derartige Nanopartikel können Arzneistoffe oder anderes biologisch aktives Material kovalent, ionisch oder adsorptiv gebunden oder in das Material der Nanopartikel inkorporiert werden.

- 20 Bisher waren jedoch nur Nanopartikel aus Polyalkylcyanoacrylaten, die mit Polysorbat 80 (Tween® 80) oder anderen Tensiden überzogen wurden, in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, um hydrophile Arzneistoffe zum Liquor cerebrospinalis zu transportieren und pharmakologische Effekte hervorzurufen. Der Mechanismus dieses Transports beruht nach bisherigen Untersuchungen darauf, dass Apolipoprotein E (ApoE) durch den Überzug aus Polysorbat 80 von den Nanopartikeln adsorbiert wird. Dadurch täuschen diese Partikel vermutlich Lipoprotein-Partikel vor, die von den LDL-Rezeptoren der Gehirnkapillar-Endothelzellen, welche die Lipidversorgung des Gehirns gewährleisten, erkannt und gebunden werden.

- 35 Eine Reihe von Arzneistoffen konnte mittels mit Polysorbat 80 oder anderen Tensiden überzogenen Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikeln über die Blut-Hirn-Schranke transportiert werden.

den und einen signifikanten pharmakologischen Effekt hervorrufen. Beispiele für derartig verabreichte Arzneimitteln sind Dalargin, ein Endorphin-Hexapeptid, Loperamid und Tubocuarin, die beiden NMDA-Rezeptor-Antagonisten MRZ 2/576 bzw.

5 MRZ 2/596 der Fa. Merz, Frankfurt, sowie das Antikrebsmittel Doxorubicin.

Die Nachteile der Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel liegen jedoch darin, dass Polysorbat 80 nicht physiologisch ist und
10 dass der Transport über die Blut-Hirn-Schranke möglicherweise auf einem toxischen Effekt des Polysorbat 80 beruhen könnte. Ein Überzug von Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikeln mit Polysorbat 80 oder anderen Tensiden ist jedoch essentiell für den Transport der Polybutylcyanoacrylat-

15 Nanopartikel über die Blut-Hirn-Schranke. Die bekannten Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel haben jedoch den weiteren Nachteil, dass sowohl die Bindung des ApoE als auch der Arzneistoffe nur adsorptiv erfolgt. Dadurch liegt das an die Nanopartikel gebundene ApoE bzw. der Arzneistoff im Gleichgewicht mit freiem ApoE bzw. Arzneistoff vor, und es kann
20 nach Injektion in den Organismus eine schnelle Desorption dieser Stoffe von den Partikeln erfolgen. Außerdem binden die meisten Arzneistoffe nicht in ausreichendem Maß an Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel und können somit nicht mit
25 Hilfe dieses Trägersystems über die Blut-Hirn-Schranke transportiert werden.

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, Nanopartikel zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke bereitzustellen, welche die vorgenannten Nachteile nicht haben und
30 die unter Vermeidung nicht physiologischer Tenside das für den Transport über die Blut-Hirn-Schranke notwendige Apolipoprotein E nicht lediglich adsorbiert haben.

35 Die Aufgabe wurde überraschenderweise durch Nanopartikel gelöst, die aus einem hydrophilen Protein oder einer Kombination hydrophiler Proteine, vorzugsweise aus Serumalbumin,

besonders bevorzugt aus humanem Serumalbumin, oder einem vergleichbaren Protein bestehen, an die Apolipoprotein E kovalent oder über das Avidin/Biotin-System gekoppelt ist.

5 Bei den Albuminen handelt es sich um eine Gruppe von Proteinen, die vor allem in tierischen/menschlichen Flüssigkeiten, z.B. das Serumalbumin im Blut, oder Geweben vorkommen. Albumine sind reich an negativ geladenen Aminosäuren sowie an Leucin und Isoleucin. Im Vergleich zu den sie begleitenden
10 Globulinen besitzen die Albumine niedrigere Molmassen und sind erst durch relativ hohe Salzkonzentrationen ausfällbar.

Auch Gelatine A, Gelatine B, Casein oder vergleichbare Proteine sind als Ausgangsproteine für die erfindungsgemäßen
15 Nanopartikel geeignet.

Das Apolipoprotein E ist eine Komponente der Lipoprotein-Komplexe. Diese Komplexe aus Lipiden und Apolipoproteinen ermöglicht den Transport der im Wasser unlöslichen Lipide im
20 Blut. Das ApoE vermittelt vermutlich den Transport der erfindungsgemäßen Nanopartikel über die Blut-Hirn-Schranke, indem es an die LDL-Rezeptoren der Gehirnkapillar-Endothelzellen bindet.

25 Die erfindungsgemäßen Nanopartikel können zusätzlich ein oder mehrere funktionelle Proteine aufweisen, die über bifunktionale Spacermoleküle an Thiolgruppen der mit Thiolgruppen modifizierten Nanopartikel gebunden sind. Zur Präparation derartiger Nanopartikel können die auf der Ober-
30 fläche der Nanopartikel befindlichen funktionellen Gruppen (Aminogruppen, Carboxylgruppen, Hydroxylgruppen) durch geeignete Reagenzien zu reaktiven Thiolgruppen umgesetzt werden. Funktionelle Proteine können dann über bifunktionale Spacermoleküle, die eine Reaktivität sowohl gegenüber Amino-
35 gruppen als auch freien Thiolgruppen aufweisen, an die Thiolgruppen-modifizierten Nanopartikel gebunden werden.

Die auf diese Weise an die Nanopartikel zu koppelnden funktionellen Proteine können aus der Gruppe ausgewählt werden, die Avidin, Avidinderivate, Apolipoproteine, wie z. B. Apolipoprotein E, aber auch Antikörper, Enzyme und dergleichen umfaßt. Dabei können die funktionellen Proteine selbst eine pharmakologische oder biologische Wirkung haben.

In einer bevorzugten Ausführungsform weisen die erfindungsgemäßen Nanopartikel kovalent gekoppeltes Avidin auf, über das biotinyliertes Apolipoprotein E gebunden werden kann, wie in Figur 1 veranschaulichend dargestellt ist. Avidin selbst ist ein für Biotin hochaffines Glykoprotein, das durch die zuvor erwähnten bifunktionalen Spacermoleküle kovalent an die Thiolgruppen der thiolierten Nanopartikel gebunden sein kann. Durch die kovalente Bindung des Avidins an die Nanopartikel kann nicht nur biotinyliertes ApoE, das für den Transport über die Blut-Hirn-Schranke notwendig ist, gebunden werden, sondern es können eine Vielzahl von biotinylierten Molekülen besonders effizient von den Avidin-modifizierten Nanopartikeln gebunden werden. Besonders bevorzugt werden dabei pharmakologisch oder biologisch aktive Moleküle.

Um pharmakologische Effekte zu vermitteln, können die erfindungsgemäßen Nanopartikel pharmakologisch oder biologisch aktive Substanzen aufweisen. Diese Wirkstoffe können in die Nanopartikel inkorporiert sein oder werden von den Nanopartikeln gebunden. Dabei kann die Bindung der pharmakologisch oder biologisch aktiven Wirkstoffe sowohl kovalent, komplexierend über das Avidin-Biotin-System als auch inkorporativ oder adsorptiv erfolgen.

Die erfindungsgemäßen Nanopartikel eignen sich besonders gut, um Arzneistoffe, die keinen oder keinen ausreichenden Übergang über die Blut-Hirn-Schranke aufweisen, wie beispielsweise Dalargin, Loperamid, Tubocuarin oder Doxorubicin oder dergleichen, zu binden und über die Blut-Hirn-Schranke

zu transportieren und pharmakologische Effekte hervorzurufen.

Das Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Nanopartikeln aus einem hydrophilen Protein oder einer Kombination hydrophiler Proteine zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke umfaßt die folgenden Schritte:

- Desolvatieren einer wäßrigen Lösung eines hydrophilen Proteins oder einer Kombination hydrophiler Proteine,
- Stabilisieren der durch Desolvatation entstandenen Nanopartikel durch Quervernetzung,
- Umsetzen eines Teils der funktionellen Gruppen auf der Oberfläche der stabilisierten Nanopartikel zu reaktiven Thiolgruppen,
- kovalentes Anheften funktioneller Proteine mittels bifunktionaler Spacermoleküle,
- Biotinylierung von Apolipoprotein E, sofern die Partikel nicht kovalent gekoppeltes Apolipoprotein E aufweisen,
- Beladen der Avidin-modifizierten Nanopartikel mit biotinyliertem ApoE und dem zu verabreichenden pharmakologischen Wirkstoff.

Für die Herstellung der Nanopartikel wird ein hydrophiles Protein oder eine Kombination hydrophiler Proteine als Ausgangsmaterial verwendet. Vorzugsweise wird eine wäßrige Lösung von Serumalbumin, besonders bevorzugt von humanem Serumalbumin, unter Rühren desolvatisiert. Die entstehenden Nanopartikel werden durch Quervernetzung stabilisiert und die funktionellen Gruppen (Aminogruppen, Carboxylgruppen, Hydroxylgruppen) auf der Oberfläche der Nanopartikel werden durch geeignete Reagenzien zu reaktiven Thiolgruppen umgesetzt.

Die Desolvatation aus dem wäßrigen Lösungsmittel erfolgt vorzugsweise durch den Zusatz von Ethanol. Prinzipiell ist eine Desolvatation auch durch den Zusatz anderer wasser-mischbarer Nichtlösungsmittel für hydrophile Proteine wie Aceton, Isopropanol oder Methanol möglich. So wurde Gelatine als Ausgangsprotein erfolgreich durch Zugabe von Aceton desolvatisiert. Gleichfalls ist eine Desolvatation von in wäßriger Phase gelösten Proteinen durch Zugabe von strukturbildenden Salzen wie Magnesiumsulfat oder Ammoniumsulfat möglich. In diesem Fall spricht man von Aussalzen.

Als Quervernetzer zur Stabilisierung der Nanopartikel kommen bifunktionale Aldehyde, vorzugsweise Glutaraldehyd, sowie Formaldehyd in Frage. Ferner ist eine Quervernetzung der Nanopartikelmatrix durch thermische Prozesse möglich. Stabile Nanopartikelsysteme wurden bei 60°C über Zeiträume von mehr als 25 Stunden oder 70°C über Zeiträume von mehr als 2 Stunden erhalten.

Die Thiolierung der Nanopartikeloberfläche kann nach verschiedenen Prinzipien durchgeführt werden. Vorzugsweise werden die Aminogruppen auf der Partikeloberfläche mit 2-Iminothiolan, das mit primären Aminogruppen auf der Partikeloberfläche reagiert, zu freien Thiolgruppen auf der Partikeloberfläche umgesetzt. Daneben können Thiolgruppen auch durch reduktive Spaltung der an der Oberfläche der Nanopartikelmatrix vorhandenen Disulfid-Bindungen mit Dithiotreitol (DTT) erhalten werden. Alternativ können freie Carboxylgruppen der Partikeloberfläche mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) / Cystein oder mit EDC / Cystaminiumdichlorid umgesetzt und die so eingeführten Disulfid-Bindungen nachfolgend mit DTT reduktiv gespalten werden.

Funktionelle Proteine können über bifunktionale Spacermoleküle, die eine Reaktivität sowohl gegenüber Aminogruppen als auch gegenüber freien Thiolgruppen aufweisen, an die

Thiolgruppen-modifizierten Nanopartikel gekoppelt werden. Anwendbar sind heterobifunktionale Spacermoleküle mit Reaktivitäten gegenüber Carboxyl- oder Hydroxylgruppen, aber auch homobifunktionale Spacermoleküle mit Reaktivitäten gegenüber Aminogruppen. Eine bevorzugte Substanz, die die Funktion eines bifunktionalen Spacermoleküls übernehmen kann, ist m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimidester (Sulfo-MBS). Neben m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimidester wurden auch weitere heterobifunktionale Spacermoleküle wie Sulfosuccinimidyl-4-[N-maleimidomethyl]-cyclohexan-1-carboxylat (Sulfo-SMCC) oder Sulfosuccinimidyl-2-[m-azido-o-nitrobenzamido]-ethyl-1,3'-dithiopropionat (SAND) sowie die homobifunktionalen Spacermoleküle Dimethyl-3,3'-dithiobispropionimidat-dihydrochlorid (DTBP) oder 3,3'-Dithiobis[sulfo-succinimidylpropionat] (DTSSP) erfolgreich eingesetzt. Es werden jedoch heterobifunktionale Spacermoleküle bevorzugt, da homobifunktionale Spacermoleküle als Nebenreaktion zu der Anbindung eines funktionalen Proteins an die Nanopartikeloberfläche auch zu einer möglichen intramolekularen Quervernetzung führen.

In einem besonders bevorzugten Verfahren wird Avidin oder ein Avidin-Derivat mittels der bifunktionalen Spacermoleküle an die thiolierten Nanopartikel gekoppelt. Dieses Zwischenprodukt, Avidin-modifizierte Nanopartikel, stellt ein universelles Trägersystem für eine Vielzahl biotinylierter Substanzen dar, die über die Avidin-Biotin-Komplexbildung gebunden werden können.

Zur Bindung des humanen Apolipoproteins E an die Avidin-modifizierten Nanopartikel kann das Apolipoprotein E durch Umsetzung mit N-Hydroxysuccinimidobiotin (NHS-Biotin) biotinyliert werden. Andere Biotinylierungsreagenzien, die mit Aminogruppen oder anderen funktionellen Gruppen des zu bindenden Proteins reagieren, sind ebenfalls anwendbar. Als weitere funktionelle Gruppen des zu bindenden Proteins kommen für die Biotinylierung auch freie Sulfhydrylgruppen oder

Carboxylgruppen in Frage. Alternative Biotinylierungsreagenzien für Aminogruppen unterscheiden sich von dem NHS-Biotin in der aminoreaktiven Funktionalität, indem sie z.B. Pentafluorphenyl-Gruppen anstelle von Succinimido-Gruppen haben, oder in dem Bereich zwischen Biotin und der aminoreaktiven Funktionalität.

Um pharmakologische Effekte zu vermitteln, werden pharmazeutisch oder biologisch aktive Substanzen in die Partikel eingearbeitet oder direkt bzw. indirekt an die Avidinmodifizierten Nanopartikel gebunden. Die Avidinmodifizierten Nanopartikel können gleichzeitig oder in beliebiger Reihenfolge mit biotinyliertem Apolipoprotein E und einem pharmazeutischen Wirkstoff beladen werden. Dabei kann die Bindung des Wirkstoffes sowohl kovalent, komplexierend über das Avidin-Biotin-System als auch adsorptiv erfolgen.

Die erfindungsgemäßen Nanopartikel aus einem hydrophilen Protein oder einer Kombination hydrophiler Proteine, die Apolipoprotein E gebunden haben, eignen sich, pharmazeutisch oder biologisch aktive Wirkstoffe, die sonst die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren würden, insbesondere hydrophile Wirkstoffe, über die Blut-Hirn-Schranke zu transportieren und pharmakologische Effekte hervorzurufen. Beispiele für derartige Wirkstoffe sind Dalargin, Loperamid, Tubocuarin, Doxorubicin oder dergleichen.

Somit sind die beschriebenen wirkstoffbeladenen Nanopartikel zur Behandlung einer Vielzahl cerebraler Erkrankungen geeignet. Dabei werden die an das Trägersystem gebundenen Wirkstoffe nach dem jeweiligen Therapieziel ausgewählt. Das Trägersystem bietet sich vor allem für die Wirkstoffe an, die keinen oder keinen ausreichendem Übergang über die Blut-Hirn-Schranke aufweisen. Als Wirkstoffe kommen Zytostatika zur Therapie cerebraler Tumore in Betracht, Wirkstoffe zur Therapie viraler Infektionen im Cerebralbereich, beispielsweise HIV-Infektionen, aber auch Wirkstoffe zur Therapie von

Demenz-Erkrankungen, um nur einige Anwendungsgebiete aufzuzählen.

FIG. 1 zeigt eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Nanopartikel ohne Wirkstoff oder weiteres funktionelles Protein.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand einer beispielhaften Ausführungsform veranschaulicht, wobei diese Darstellung den Sinn und das Wesen der Erfindung in keiner Weise einschränkend aufgefasst werden soll.

Zur Herstellung von Nanopartikeln aus humanem Serumalbumin (HSA) wurden 200 mg humanes Serumalbumin in 2,0 ml gereinigtem Wasser gelöst. Zu dieser Lösung wurden unter Rühren auf einem Magnetrührer (500 rpm) 8,0 ml 96 Vol.-% Ethanol tropfenweise zugegeben.

Die erzeugten Nanopartikel wurden stabilisiert, indem dem Reaktionsansatz 235 µl einer wässrigen, 8%-igen (m/v) Glutaraldehydlösung zugegeben und über 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wurde. Die stabilisierten Nanopartikel wurden durch fünfmaliges Abzentrifugieren (16.000 rcf, 8 min) und Redispergieren in 1,5 ml gereinigtem Wasser aufgereinigt. Durch gravimetrische Bestimmung wurde der resultierende Gehalt von Nanopartikeln in der Suspension festgestellt.

Anschließend wurden 2,0 ml der Nanopartikel-Suspension mit 2,0 ml einer Lösung von 13 mg 2-Iminoethiolan (Traut's Reagenz) in Tris-Puffer (pH 8,5) versetzt und über 24 Stunden gerührt, um die Partikeloberfläche zu thiolieren. Die Nanopartikel wurden nach Thiolierung wie oben beschrieben aufgereinigt.

Das Avidin-Derivat NeutrAvidin™ wurde über m-Maleimido-benzoyl-N-hydroxysulfosuccinimidester (Sulfo-MBS), eine als

bifunktionales Spacermolekül fungierende Substanz, kovalent an die thiolierten Nanopartikeln gebunden. Zu diesem Zweck wurde das Avidin-Derivat aktiviert, indem eine Lösung von 5,0 mg NeutrAvidin™ in 1,0 ml PBS-Puffer (pH 7,0) mit 1,6 mg Sulfo-MBS versetzt und über 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt wurde. Freies Sulfo-MBS wurde über eine Größenausschlußchromatographie von dem aktivierten NeutrAvidin abgetrennt.

- 10 Die Fraktionen, in denen durch spektrophotometrische Detektion bei 280 nm Wellenlänge NeutrAvidin nachgewiesen werden konnte, wurden vereinigt und mit 2,0 ml der thiolierten Nanopartikel versetzt und über 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Avidin-modifizierten HSA-Nanopartikel wurden
15 wie oben beschrieben aufgereinigt.

- Apolipoprotein E (ApoE) wurde biotinyliert, indem 250 µg ApoE in 125 µl isotonem PBS-Puffer, pH 7,4, gelöst wurden und diese Lösung mit einer Lösung von 150 µg NHS-Biotin (N-Hydroxysuccinimidobiotin) in 15 µl DMSO versetzt wurde. Nach
20 einer Reaktionszeit von 2 Stunden bei 10°C unter Rühren wurde diese Mischung mit weiteren 300 µl PBS-Puffer, pH 7,4, verdünnt. Noch freies NHS-Biotin wurde über eine Größenausschlußchromatographie von dem biotinylierten ApoE abgetrennt. Die Fraktionen, in denen durch photometrische Detek-
25 tion bei 280 nm Wellenlänge ApoE nachweisbar war, wurden vereinigt und gefriergetrocknet.

- Die Avidin-modifizierten HSA-Nanopartikel wurden unmittelbar
30 vor dem Tierversuch mit dem biotinylierten ApoE und dem Arzneistoff Dalargin beladen. Hierzu wurde das gefriergetrocknete ApoE in 250 µl destilliertem Wasser gelöst und mit 280 µl einer HSA-Nanopartikelsuspension, die 5,9 mg Avidin-modifizierte HSA-Nanopartikel enthielt, versetzt. Eine Lösung von 1,125 mg Dalargin in 470 µl Wasser wurde zugegeben
35 und die Mischung wurde über 3 Stunden bei Raumtemperatur in-

kubiert. Nach dieser Inkubation wurde die Mischung durch Zugabe von 500 µl isotonem PBS-Puffer, pH 7,4, verdünnt.

Eine Quantifizierung der Beladung der Avidin-modifizierten HSA-Nanopartikel mit Dalargin ergab, dass bei einem Verhältnis von Dalargin / Nanopartikeln = 191 µg/mg eine adsorptive Bindung von 23,7 µg/mg (= 12,4%) Dalargin erfolgte.

Die applikationsfertige Zubereitung enthielt in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml isotonem PBS-Puffer:

- 3,93 mg/ml Avidin-modifizierte HSA-Nanopartikel
- 167 µg/ml ApoE (über Avidin-Biotin-System an die Nanopartikel gebunden)
- 0,75 mg/ml Dalargin (davon 12,4 % adsorptiv an Nanopartikel gebunden).

Die Zubereitung wurde Mäusen i.v. in einer Dosierung von 7,5 mg/kg Dalargin appliziert. Das entspricht ausgehend von einem durchschnittlichen Körpergewicht einer Maus von 20 g, einer Applikationsmenge von 200 µl der oben aufgeführten Zubereitung je Maus.

Der analgetische Effekt (Nociceptive Response) wurde mit Hilfe des Tail-Flick-Tests ermittelt, bei dem ein heisser Lichtstrahl auf den Schwanz der Maus projiziert und die Zeit gemessen wird, bis die Maus den Schwanz wegzieht. Nach 10 Sekunden (= 100 % MPE) wurde das Experiment abgebrochen, um der Maus keinen Schaden zuzufügen. Der maximal mögliche analgetische Effekt (MPE = maximally possible effect) wurde gemäß der folgenden Formel ermittelt:

$$\% \text{ MPE} = \frac{\text{Reaktionszeit nach Applikation} - \text{Reaktionszeit vor Applikation}}{\text{Abbruchzeit} - \text{Reaktionszeit vor Applikation}} \times 100$$

Negative MPE-Werte ergeben sich, wenn die Maus ihren Schwanz nach Gabe der Zubereitung früher wegzieht als vor der Behandlung.

Mit Hilfe Dalargin-beladener Avidin-modifizierter HSA-Nanopartikel wurden nach intravenöser Injektion die in Tabelle 1 dargestellten analgetischen Effekte erreicht.

5

Tabelle 1

Analgetischer Effekt [% MPE] bei Mäusen (n=6) nach i.v. Applikation von Dalargin (7,5 mg/kg) in Form einer der aufgeführten Präparationen. (MPE = Maximal Possible Effect)

Präparation	30 min	45 min	90 min	120 min
HSA-Avidin-Nanopartikel + ApoE + Dalargin	25,1 ± 12,4	49,0 ± 23,7	2,1 ± 19,6	-0,23 ± 12,3
Kontrollen*				
HSA-Avidin-Nanopartikel + Dalargin	-2,6 ± 3,9	-5,4 ± 10,9	-14,4 ± 17,4	-9,6 ± 20,6
PBCA-Nanopartikel + Dalargin + Polysorbat 80	35,2 ± 5,8	49,5 ± 4,5	36,5 ± 13,7	7,1 ± 6,3
Dalargin-Lösung	10,0 ± 9,8	9,3 ± 2,8	4,7 ± 5,1	2,0 ± 6,1

* Die PBCA-Nanopartikel + Dalargin + Polysorbat 80 und die Dalargin-Lösungs-Vergleichsdaten stammen aus einem früheren Experiment.

Die Ergebnisse zeigen, dass die mit den Avidin-modifizierten HSA-Nanopartikeln erzielten analgetischen Effekte den Effekten entsprechen, die mit den Polybutylcyano-acrylat Nanopartikeln (PBCA-Nanopartikel) erreicht werden können.

10

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Nanopartikel zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke,
5 dadurch gekennzeichnet, dass sie aus einem hydrophilen Protein oder einer Kombination hydrophiler Proteine bestehen, an die Apolipoprotein E gekoppelt oder gebunden ist.
- 10 2. Nanopartikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das mindestens ein hydrophiles Protein aus der Gruppe ausgewählt ist, die Serumalbumin, Gelatine A, Gelatine B, Casein und vergleichbare Proteine, oder eine Kombination dieser Proteine umfaßt.
- 15 3. Nanopartikel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein hydrophiles Protein humanen Ursprungs ist.
- 20 4. Nanopartikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein oder mehrere unterschiedliche funktionelle Proteine aufweisen, die über bifunktionale Spacermoleküle an Thiolgruppen von Thiolgruppen-modifizierten Nanopartikeln gebunden sind.
- 25 5. Nanopartikel nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die funktionellen Proteine ausgewählt sind aus der Gruppe, die Avidin, Avidin-Derivate, Apolipoproteine, Antikörper, Enzyme, Hormone, Zytostatika und dergleichen
30 umfaßt.
6. Nanopartikel nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass biotinyliertes Apolipoprotein E über kovalent gekoppeltes Avidin gebunden ist.
- 35 7. Nanopartikel nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein weiteres biotinyliertes funktionel-

les Protein über kovalent gekoppeltes Avidin gebunden ist.

8. Nanopartikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
5 dadurch gekennzeichnet, dass sie pharmakologisch oder biologisch aktive Wirkstoffe inkorporiert oder gebunden haben.

9. Nanopartikel nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet,
10 dass die pharmakologisch oder biologisch aktiven Wirkstoffe auf der Partikeloberfläche gebunden sind.

10. Nanopartikel nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet,
15 dass die pharmakologisch oder biologisch aktiven Wirkstoffe kovalent, komplexierend über das Avidin-Biotin-System oder adsorptiv gebunden sind.

11. Nanopartikel nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet,
20 dass die Wirkstoffe ausgewählt sind aus der Gruppe, die Dalargin, Loperamid, Tubocuarin und Doxorubicin umfaßt.

12. Verfahren zur Herstellung von Nanopartikeln aus einem
25 hydrophilen Protein oder einer Kombination hydrophiler Proteine, zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgenden Schritte umfaßt:

- 30 - Desolvatieren einer wäßrigen Lösung eines hydrophilen Proteins oder einer Kombination hydrophiler Proteine,
- Stabilisieren der durch Desolvatation entstandenen Nanopartikel durch Quervernetzung,
- Umsetzen eines Teils der funktionellen Gruppen auf
35 der Oberfläche der stabilisierten Nanopartikel zu reaktiven Thiol-Gruppen,

- kovalentes Anheften funktioneller Proteine, vorzugsweise von Avidin, mittels bifunktionaler Spacermoleküle,
- Biotinylierung des Apolipoprotein E,
- Beladen der Avidin-modifizierten Nanopartikel mit biotinyliertem Apolipoprotein E,
- Beladen der Avidin-modifizierten Nanopartikel mit biotinyliertem Apolipoprotein E und weiteren funktionellen Proteinen oder pharmazeutisch oder biologisch aktiven Wirkstoffen.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das hydrophile Protein aus der Gruppe ausgewählt ist, die Serumalbumin, Gelatine A, Gelatine B, Casein und vergleichbare Proteine, oder eine Kombination dieser Proteine umfaßt.

14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, dass das hydrophile Protein humanen Ursprungs ist.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Desolvatieren durch Rühren und Zugabe eines wassermischbaren Nichtlösungsmittels für hydrophile Proteine oder durch Aussalzen erfolgt.

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass das wassermischbare Nichtlösungsmittel für hydrophile Proteine aus der Gruppe ausgewählt wird, die Ethanol, Methanol, Isopropanol, und Aceton umfaßt.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass zum Stabilisieren der Nanopartikel ~~thermische Prozesse oder bifunktionale Aldehyde oder~~ Formaldehyd verwendet wird.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass als bifunktionales Aldehyd Glutaraldehyd verwendet wird.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass als Thiolgruppen-modifizierendes Agens eine Substanz verwendet wird, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die 2-Iminothiolan, eine Kombination aus 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid und Cystein oder eine Kombination aus 1-Ethyl-3-(3-
- 5 dimethylaminopropyl)carbodiimid und Cystaminiumdichlorid sowie Dithiotreitol umfaßt.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass als bifunktionales Spacermolekül
- 15 eine Substanz verwendet wird, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimidester, Sulfosuccinimidyl-4-[N-maleimido-methyl]cyclohexan-1-carboxylat, Sulfosuccinimidyl-2-[m-azido-o-nitrobenzamido]-ethyl-1,3'-dithiopropionat, Dimethyl-3,3'-dithiobispropionimidat-dihydrochlorid und
- 20 3,3'-Dithiobis[sulfosuccinimidylpropionat] umfaßt.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Wirkstoffe ausgewählt sind aus
- 25 der Gruppe, die Dalargin, Loperamid, Tubocuarin und Doxorubicin umfaßt.
22. Verwendung von Nanopartikeln, umfassend ein hydrophiles Protein oder eine Kombination hydrophiler Proteine, die
- 30 Apolipoprotein E gebunden haben, zum Transport pharmazeutisch oder biologisch aktiver Wirkstoffe über die Blut-Hirn-Schranke.
23. Verwendung nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet,
- 35 dass mindestens eines der hydrophilen Proteine aus der Gruppe ausgewählt ist, die Serumalbumin, Gelatine A, Ge-

latine B, Casein und vergleichbare Proteine, oder eine Kombination dieser Proteine umfaßt.

24. Verwendung nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eines der hydrophilen Proteine humanen Ursprungs ist.

25. Verwendung von Nanopartikeln nach einem der Ansprüche 22 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Wirkstoffe ausgewählt sind aus der Gruppe, die Dalargin, Loperamid, Tubocuarin und Doxorubicin umfaßt.

26. Verwendung von Nanopartikeln nach einem der Ansprüche 22 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass sie zur Behandlung cerebraler Erkrankungen eingesetzt werden.

20

25

30

35

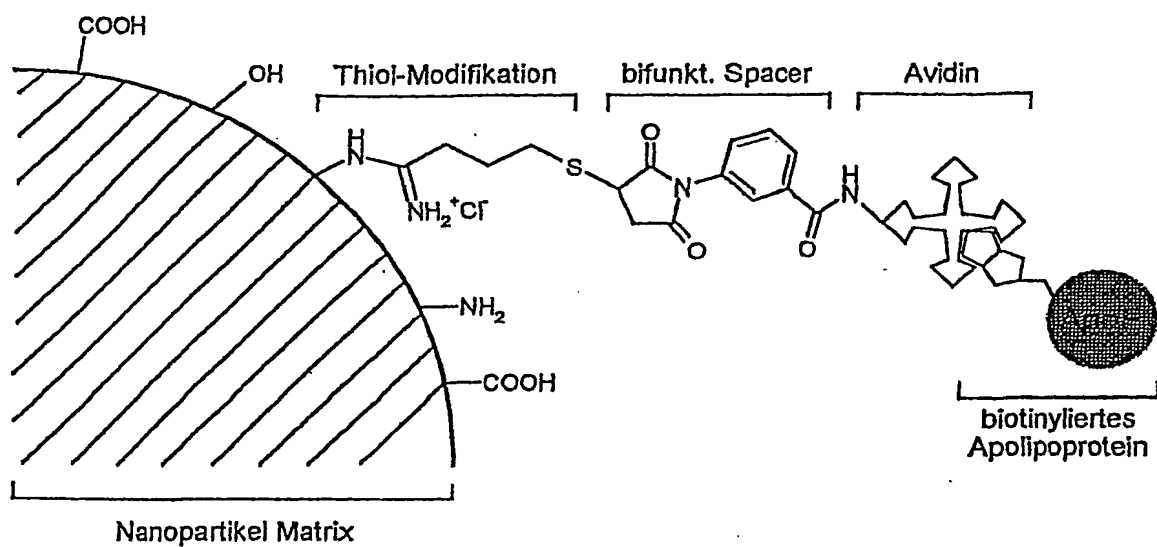


FIG. 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In **onal Application No**
PCT/EP 02/04735

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K9/51 A61K47/42 A61K47/48 A61P25/04 A61P25/28
A61K31/197 A61K31/451 A61K31/4741 A61K31/704

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>LANGER K ET AL: "Preparation of avidin-labeled protein nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid"</p> <p>EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 49, no. 3, 2 May 2000 (2000-05-02), pages 303-307, XP004257171</p> <p>ISSN: 0939-6411</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

*** Special categories of cited documents:**

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 August 2002

Date of mailing of the international search report

30/08/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Felder, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/04735

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KREUTER J ET AL: "INFLUENCE OF THE TYPE OF SURFACTANT ON THE ANALGESIC EFFECTS INDUCED BY THE PEPTIDE DALARGIN AFTER ITS DELIVERY ACROSS THE BLOOD-BRAIN BARRIER USING SURFACTANT-COATED NANOPARTICLES" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 49, no. 1, 10 November 1997 (1997-11-10), pages 81-87, XP000667154 ISSN: 0168-3659	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 02/04735

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

MISSING AT THE TIME OF PUBLICATION

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/04735

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 A61K9/51 A61K47/42 A61K47/48 A61P25/04 A61P25/28 A61K31/197 A61K31/451 A61K31/4741 A61K31/704		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 A61K A61P		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	LANGER K ET AL: "Preparation of avidin-labeled protein nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid" EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, Bd. 49, Nr. 3, 2. Mai 2000 (2000-05-02), Seiten 303-307, XP004257171 ISSN: 0939-6411 --- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : 'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist 'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist 'I' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) 'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht 'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist 'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist 'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden 'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist '8' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
12. August 2002		30/08/2002
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Beauftragter Felder, C

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

I onales Aktenzeichen

PCT/EP 02/04735

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>KREUTER J ET AL: "INFLUENCE OF THE TYPE OF SURFACTANT ON THE ANALGESIC EFFECTS INDUCED BY THE PEPTIDE DALARGIN AFTER ITS DELIVERY ACROSS THE BLOOD-BRAIN BARRIER USING SURFACTANT-COATED NANOPARTICLES" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, Bd. 49, Nr. 1, 10. November 1997 (1997-11-10), Seiten 81-87, XP000667154 ISSN: 0168-3659</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/04735

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl die Ansprüche 22-26 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich _____
3. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt: _____

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.